NK 细胞无血清扩增培养套装（2L 培养体系）

说明书

【产品名称】

通用名称：NK 细胞无血清扩增培养套装

英文名称：NK Cell Serum-free Expansion Kit

【产品概述】

NK 细胞无血清扩增培养套装适用于自体外周血 PBMC 和脐血 CBMC，经体外活化扩增获得纯度较高的 NK 细胞。仅限科学研究使用。

【产品规格与保存】

产品名称	产品组成	产品货号	规格	数量	储存条件	有效期
NK 细胞扩增培养基组合	NK 细胞无血清扩增培养基	PMK-M007B	1L/瓶	2 瓶	2℃~8℃避光保存	12 个月
	NK 细胞无血清扩增培养基添加组分	PMK-M007B-S	8ml/瓶	2 瓶	2℃~8℃避光保存	12 个月
NK 细胞诱导因子组合	NK-A 因子	PMK-M007S-2L	1ml/支	2 支	-20℃避光保存	12 个月
	NK-B 因子		250μl/支	1 支		
	NK-C 因子		250μl /支	1 支		
	NK-D 因子		250μl /支	1 支		
	NK-E 因子		1ml/支	2 支		

【试剂准备】

配制完全培养基（1L）：添加 1 瓶 **NK 细胞无血清扩增培养基添加组分（PMK-M007B-S）**至 1L **NK 细胞无血清扩增培养基（PMK-M007B）**中，混匀后添加 1 支 **NK-A 因子**，混匀备用。（另一瓶完全培养基按需适时添加 NK 细胞无血清扩增培养基添加组分和 NK-A 因子到 1L NK 细胞无血清扩增培养基中备用）。注：每次添加的培养基需提前取出放置室温复温，禁止将整瓶培养基放入 37℃孵箱反复预温。

【参考补液程序】

步骤	时间	试剂	容器	完全培养基	灭活血浆	总体积	备注
准备	D0	添加组分NK-A因子	/	1L	/	1L	先将1瓶添加组分添加至1L**扩增培养基**中，混匀后将1支NK-A因子添加至**该扩增培养基**中，混匀备用（另1瓶添加组分和1支NK-A因子按需适时添加到另一瓶1L扩增培养基中备用）。
接种	D0	NK-B因子 NK-C因子 NK-E因子	T75瓶	18ml	1ml	20ml	无需包被， 直接混合刺激。
刺激	D3（第1次补液）	NK-D因子 NK-E因子	T75瓶	18ml	1ml	40ml	在培养瓶中补加1支NK-D因子和1支NK-E因子，混匀。
换瓶	D5（第2次补液）	完全培养基	T175瓶	40ml - 60ml	2-3ml	80ml - 100ml	使用移液枪将细胞转移至新T175瓶，用培养基冲洗T75瓶残留细胞，随后转移至T175瓶。
扩增	D7（第3次补液）	完全培养基	T175瓶	按密度补液	5%血浆	160ml - 250ml	补液后，细胞密度维持在80万-150万个细胞/ml，根据细胞总体积分瓶或转培养袋培养。
	D9（第4次补液）	完全培养基	培养袋	按密度补液	剩余血浆	320ml - 500ml	转细胞培养袋，补液后，细胞密度维持在80万-150万个细胞/ml。
	D11/12（第5次补液）	完全培养基	培养袋	按密度补液	/	640ml-1000ml	
	D14（第6次补液）	完全培养基	培养袋	按密度补液	/	1280ml-2000ml	
收获	D15-18	完全培养基	培养袋	/	/	2000ml	收获细胞。

注：（1）培养基每次使用前需室温静置 1h 以上，或取所需体积置于 25℃恒温水浴槽中预热 30min 以上（禁用相关设备强制 37℃快速复温），后续操作均如此。

（2）灭活血浆以培养体系的 5%~10%计算用量，如抗凝剂较多，建议血浆提高到 7%~12%。

（3）如无自体血浆，可以使用 AB 血清或血替，添加浓度与自体血浆保持一致。

【操作方法】

1、D0 接种-脐血 CBMC（或外周血 PBMC）分离与诱导

（1）分离血浆：取少量血样（约 300μl）划线或滴入平皿进行检菌。室温下 400g-700g 离心 15 分钟，取离心上清作为血浆。

（2）血浆灭活：上层血浆 56℃灭活半小时，置于 4℃冰箱半小时，取出在室温下 800g-1000g 离心 10 分钟，取上清备用。

（3）分离 CBMC：等体积的生理盐水与血细胞沉淀混匀，加到样本密度分离液层上使分层保持清晰，室温下 400g 离心 25 分钟。

（4）洗涤细胞：吸取 CBMC 层，加生理盐水/PBS（加入的体积要大于 CBMC 体积）吹打混匀，室温下 300g-400g 离心 10 分钟,再次洗涤细胞。

（5）细胞计数：弃上清，用少量完全培养基重悬细胞，吸取少量细胞计数。调整细胞密度：PBMC（200 万个细胞/ml），CBMC（200 万-300 万个细胞/ml）。

（6）接种：在细胞悬液中加入 1 支 NK-B 因子、1 支 NK-C 因子和 1 支 NK-E 因子，灭活血浆 1ml，转入 T75 培养瓶内，培养终体积约 20ml。

（7）剩余血浆 4℃密封保存备用。

2、D3（第 1 次补液，补加 NK-D 因子和 NK-E 因子）

（1）1:1 补液：加入 18ml 完全培养基+1ml 灭活血浆。

（2）在培养体系中添加 1 支 NK-D 因子和 1 支 NK-E 因子，培养终体积约为 40ml 。

3、D5（第 2 次补液）

（1）转瓶：将所有细胞转移至新的 T175 瓶，用培养基冲洗 T75 瓶残留细胞，随后转移至 T175 瓶。注意收集细胞时尽量轻柔，不要破坏克隆团。

（2）1:1 补液：加入 40ml~60ml 完全培养基+2ml~3ml 灭活血浆，培养终体积约为 80ml~100ml。

4、D7（第 3 次补液）

（1）按密度补液：取样计数，加入完全培养基+5%灭活血浆（不足 5%时，则加入所有剩余血浆），培养终体积约为 160ml~250ml，使细胞密度维持在 80 万

-150 万个细胞/ml。

（2）转袋：总体积大于 250ml 即可转袋，补液后总体积小于 500ml 时，需将培养袋对折后培养。

5、D9（第 4 次补液）

按密度补液，补液后密度在 80 万-150 万个细胞/ml 范围内，将剩余血浆全部加入。

注：装袋前，轻微拍打培养瓶底部细胞，如克隆团太大可进行吹打，注意吹打的力度避免将克隆团吹成单个细胞；装袋后，需定期对培养袋进行拍打，使细胞团维持在肉眼观察针眼大小即可。

6、D11/12（第 5 次补液）

按密度补液，补液后密度在 80 万-150 万个细胞/ml 范围内。

注：装袋后，需定期对培养袋进行拍打，使细胞团维持在肉眼观察针眼大小即可。

7、D14（第 6 次补液）

（1）按密度补液，补液后密度在 80 万-150 万个细胞/ml 范围内。

（2）检验细胞：培养第 13 天，用 5ml 注射器分别从袋内抽取少量细胞悬液进行细菌、内毒素、支原体检测。

8、D15-D18（收获）

（1）检验：测密度，NK 细胞纯度。

（2）收获：离心收获细胞，若因实验需要，可相应提前或延迟收获细胞悬液。

【注意事项】

1、血样要求：脐血/外周血 30ml-60ml，建议采血后 4 小时内进行分离 CBMC/PBMC 操作，也可使用冻存的 CBMC/PBMC，活率低于 80%不建议培养。

2、种瓶数量密度：PBMC 接种量 4000 万左右，起始细胞浓度 200 万/ml，CBMC 接种量 4000 万-6000 万，起始细胞浓度 200 万-300 万/ml。

3、补液密度：补液前密度一般在 150 万-400 万个细胞/ml，补液后密度在 80 万-150 万个细胞/ml，补液后密度不可低于 60 万个细胞/ml，补液时优先按照密度补液，在不方便计数的情况下再考虑 1:1 按照体积补液。

4、培养基的使用：

（1）每次补液前需要将培养基在室温下自然复温。

（2）禁止将整瓶培养基放入 37℃孵箱复温，否则会加速补液培养基中细胞因子的失活。

（3）配制好的完全培养基（含细胞因子）时效较短，超过 20 天不建议使用，尤其是活化前期（前 7 天）。

5、正确处理和保存血浆：离心后的血浆要确保澄清，添加血浆时需考虑抗凝剂对血浆的稀释作用。

6、培养袋的使用：培养体积小于 500ml 的时候，需要折叠培养袋再进行放置。

7、灵活掌握补液时机：细胞扩增状态不理想时，可推迟补液时间，扩增较快时可以提前补液，尤其注意第一次补液的时机。装袋后的补液体积可根据培养时间的情况进行调整。

8、控制细胞结团：细胞装袋前，需要根据克隆团的情况充分拍散细胞。装袋后也需每天对袋子进行拍打，揉搓肉眼观察较大的细胞团。

9、培养初期不要随意晃动培养瓶：否则活化的克隆团容易飘起来，而降低细胞因子对细胞团的活化。

10、固定实验耗材种类和型号：需提前评估变更型号、规格对培养效果的影响，如 175 的培养瓶，细胞培养袋等。